Système de test ANA-II Plus

IVD

REF A21101

UTILISATION PRÉVUE

Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte®** ANA-II Plus a été conçu pour la détection semi-quantitative d'anticorps IgG dirigés contre huit analytes distincts (SSA, SSB, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1, centromère B et histone) dans du sérum humain, la détection quantitative d'anticorps IgG dirigés contre l'ADN bicaténaire dans du sérum humain et la détection qualitative d'anticorps IgG antinucléaires (ANA). Ce système de test a pour but d'aider à diagnostiquer diverses maladies auto-immunes systémiques. Ce test a été conçu uniquement pour des diagnostics *in vitro*.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

Normalement, le corps humain ne génère pas d'anticorps dirigés contre ses propres antigènes. L'une des fonctions clés du système immunitaire est de distinguer les antigènes étrangers (provenant notamment d'agents infectieux) des tissus de son propre organisme. Les maladies auto-immunes surviennent lorsque le système immunitaire d'une personne produit des anticorps dirigés contre des antigènes de son propre organisme (auto-anticorps). La plupart des maladies auto-immunes peuvent s'attaquer à un organe particulier ou, au contraire, à l'ensemble de l'organisme (maladie systémique).

Dans le cas d'une maladie auto-immune systémique, des lésions aux tissus et des inflammations sont observées sur plusieurs sites des organes sans relation avec leur composition antigénique et le début de la maladie se caractérise généralement par une accumulation dans les tissus de complexes immuns circulants. Ces complexes immuns sont formés par réaction auto-anticorps à des antigènes cellulaires solubles d'origine nucléaire ou plus rarement d'origine cytoplasmique. Parmi les cas les plus fréquents de maladies auto-immunes systémiques, on retrouve notamment le lupus érythémateux systémique (LES), l'arthrite rhumatoïde, la sclérodermie (et variante de CREST), la polymyosite, la connectivite mixte (MCTD), le lupus érythémateux systémique (LES) induit par un médicament et le syndrome de Sjögren.

Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus a été conçu pour contribuer au diagnostic de plusieurs maladies auto-immunes systémiques. Il peut aider à détecter et identifier plusieurs auto-anticorps dirigés contre divers constituants cellulaires nucléaires ou cytoplasmiques. Le tableau ci-dessous indique les relations entre les auto-anticorps et l'état de certaines maladies auto-immunes systémiques fréquentes.

Auto-anticorps	Maladies associées
SSA	LES, syndrome de Sjögren
SSB	Syndrome de Sjögren
Sm	LES
RNP	Connectivite mixte
Scl-70	Sclérodermie
Jo-1	Myosite
Centromère B	Sclérodermie variante de CREST (calcinose), maladie de Raynaud, dysmotilité œsophagienne, sclérodactylie et télangiectasie
Histones	LES induit par un médicament
ADN bicaténaire	LES

Bien que l'étiologie exacte des maladies auto-immunes soit inconnue et que le rôle spécifique des auto-anticorps au début de diverses maladies auto-immunes soit encore obscur, l'association et la fréquence de la détection de ces anticorps (particulièrement les IgG) par le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus constituent des outils utiles dans les analyses de laboratoire des patients présentant des signes de maladie auto-immune systémique.

Jusqu'à tout récemment, le dépistage des auto-anticorps était réalisé individuellement en immunofluorescence indirecte, en immunodiffusion radiale (Ouchterlony), en hémagglutination, en radio-immunologie ou en immunoenzymologie (ELISA). Contrairement à plusieurs autres systèmes, le système de test **AtheNA Multi-Lyte** peut évaluer simultanément plusieurs analytes différents dans le cadre d'immunoessais multiplexés. Lorsque le système de test est utilisé conformément aux instructions ci-dessous, il est possible de rechercher simultanément dans un échantillon la présence d'une multitude d'auto-antigènes à l'intérieur d'un seul puits.

PRINCIPE DU TEST

Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus a été conçu pour la détection d'anticorps de classe IgG contre une variété d'antigènes nucléaires courants dans le sérum sanguin humain. La procédure comprend deux étapes d'incubation :

1. Les échantillons de sérum à tester (correctement dilués) sont incubés dans un tube contenant un mélange de billes en suspension pour test multiplex. La suspension de billes contient un mélange de populations marquées de microsphères en polystyrène (billes) ; chaque population est associée à un antigène différent. S'ils sont présents dans les sérums du patient, les anticorps spécifiques se lieront à l'antigène fixé sur une ou plusieurs populations de billes. Les microsphères sont ensuite rincées pour éliminer les protéines sériques non-réactives.
2. Une solution d'IgG anti-humaine d'origine caprine conjuguée à de la phycoérythrine (PE) est ajoutée au micro-puits et la plaque est de nouveau incubée. Le conjugué va réagir avec les anticorps IgG fixés sur la phase solide au cours de l'étape 1. La suspension de billes est alors analysée par l'instrument **AtheNA Multi-Lyte**. Le(s) population(s) de billes est/sont triée(s) (identifiée(s)) et l'on détermine pour chaque population de billes la quantité de molécules indicatrices (conjugué PE). À l'aide de la technologie d'étalonnage intra-puits (*Intra-Well Calibration Technology®*), les populations de billes d'étalonnage internes sont utilisées pour convertir la fluorescence brute en résultats numériques.

COMPOSANTS DU SYSTÈME DE TEST

Matériel inclus :

Chaque système de test contient les composants suivants en quantité suffisante pour réaliser le nombre de tests indiqué sur l'étiquette du conditionnement. **REMARQUE : Les composants suivants contiennent de l'azoture de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau) : suspension de billes, contrôles, conjugué et SAVe Diluent®.**

SOLN	BEAD

1. Suspension de billes : La suspension contient des microsphères en polystyrène de 5,6 microns marquées qui sont conjuguées aux auto-antigènes suivants : SSA, SSB, Sm, U snRNP B/B', U1 snRNP 68, U1 snRNP A, U1 snRNP C, Scl-70, Jo-1, centromère B, AND bicaténaire, histone H et histone HLY. Une population supplémentaire de billes est incluse, contenant une préparation d'antigènes dérivée de cellules HEp-2. Cette population de billes contribue à la capacité de dépistage du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus. La suspension de billes contient également une population de billes pour la détection d'anticorps non spécifiques (s'il y en a) dans l'échantillon du patient et quatre populations de billes utilisées pour l'étalonnage de l'essai. Un flacon couleur ambre contenant 5,5 ml. Prêt à l'emploi.

CONJ

2. Conjugué : IgG anti-humaine d'origine caprine conjuguée à de la phycoérythrine (chaîne spécifique γ). Un flacon couleur ambre contenant 15 ml. Prêt à l'emploi.

CONTROL	+	1

3. Contrôle positif 1 (sérum humain) : Une ampoule de 0,2 ml avec bouchon rouge.

CONTROL	+	2

4. Contrôle positif 2 (sérum humain) : Une ampoule de 0,2 ml avec bouchon blanc.

CONTROL	+	3

5. Contrôle positif 3 (sérum humain) : Une ampoule de 0,2 ml avec bouchon bleu.

CONTROL	-

6. Contrôle négatif (sérum humain) : Une ampoule de 0,2 ml avec bouchon vert.

DIL	SPE

7. SAVe Diluent® : Un flacon de 50 ml à bouchon vert contenant une solution de tampon phosphate salin. Prêt à l'emploi. **REMARQUE :** La solution SAVe Diluent® change de couleur lorsqu'elle est combinée à du sérum.

WASHBUF	10X

8. Tampon de lavage concentré (10 x) : Dilution d'un volume de concentré dans neuf volumes d'eau distillée ou désionisée. Un flacon de 50 ml à bouchon transparent contenant une solution de tampon phosphate salin concentrée 10X.

REMARQUES :

1. **Les composants suivants ne doivent pas nécessairement être utilisés avec des systèmes de test ayant un numéro de lot correspondant et peuvent donc être librement utilisés avec des systèmes de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte : tampon de lavage et SAVe Diluent®.**
2. **Le système de test contient également :**
   a. **une étiquette de composant contenant des informations spécifiques de lot à l'intérieur de la boîte du système de test.**
   b. **un CD d'étalonnage contenant des valeurs d'étalonnage spécifiques par lot, requises pour les analyses d'échantillons et le contrôle de qualité des essais, et des notices.**
   c. **une plaque de dilution de 96 puits.**
   d. **une plaque de filtration de 96 puits.**

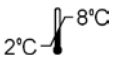
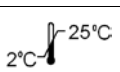
PRÉCAUTIONS

1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, ainsi que des gants et une protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs de ce produit. Jeter conformément à toutes les lois applicables.
3. La suspension de billes du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ne contient pas d'organismes vivants. Cependant, le réactif doit être considéré comme un **matériau biologique dangereux** et être manipulé comme tel.
4. Les solutions de contrôle sont des **matériaux biologiques dangereux**. Les matériaux d'origine de ces produits ont fait l'objet de tests approuvés n'ayant révélé aucune présence d'antigène du VIH-1, de HBsAg et d'anticorps contre le VHC et le VIH. Cependant, puisqu'aucune méthode de test n'offre une garantie absolue d'absence de tout agent infectieux, ces produits doivent être manipulés selon les consignes du niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (1).
5. Pour obtenir des résultats exacts, il est essentiel de respecter les délais et les températures d'incubation. **Vérifier que tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante (20 à 25 °C) avant de commencer le test.** Les réactifs non utilisés doivent être retournés à une température de réfrigération immédiatement après utilisation.
6. Un mauvais lavage peut causer de faux résultats positifs ou négatifs. S'assurer de minimiser la quantité de solution de lavage résiduelle (p. ex., par absorption ou aspiration) avant d'ajouter le conjugué. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
7. La solution SAVe Diluent®, la suspension de billes, les solutions de contrôle et le conjugué contiennent de l'azoture de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azoture de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azoture de cuivre dans la tuyauterie de laboratoire, lesquelles peuvent causer des explosions ou des détonations. Pour éviter ce risque, rincer abondamment les éviers avec beaucoup d'eau après y avoir jeté une solution contenant de l'azoture de sodium.
8. Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
9. La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
10. Ne pas utiliser les réactifs d'autres fournisseurs ou fabricants.
11. Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
12. Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
13. Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
14. Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
15. Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation. La suspension de billes et le conjugué sont des réactifs photosensibles. Tous deux ont été conditionnés dans des emballages photoprotecteurs. Des niveaux normaux d'exposition à la lumière au cours de l'exécution de l'essai n'affecteront pas les performances de ce dernier. Ne pas exposer inutilement ces réactifs à des sources puissantes de lumière visible.
16. Récupérer la solution de lavage dans un bassin à résidus. Traiter la solution résiduelle avec un désinfectant (p. ex., 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs de javel.
17. Mise en garde : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
18. Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azoture de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azoture de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
19. Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de la javel ni même aux odeurs fortes s'échappant d'une solution contenant de la javel. De très petites quantités de javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de plusieurs réactifs de ce système de test.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 à 200 µl.
2. Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 à 200 µl.
3. Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
4. Pipettes sérologiques.
5. Embouts de pipettes jetables.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
8. Bassin de résidus et de désinfectant (p. ex., 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium).
9. Système **AtheNA Multi-Lyte** (instrument Luminex®) avec fluide d'entraînement (produit n° 40-50000).
10. Eau distillée ou désionisée.
11. Vortex.
12. Petit bain de sonication.
13. Un agitateur de plaque pouvant atteindre la vitesse de 800 r/min (optionnel pour mélanger).
14. Système et embout d'aspiration pour le lavage des microsphères.

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Suspension de billes : Retirer uniquement la quantité nécessaire pour analyser les échantillons devant être testés, puis restocker toute quantité non utilisée.
	Conjugué : NE PAS CONGELER.
	Système de test non ouvert, solutions de contrôle positif, solutions de contrôle négatif, solution SAVe Dilent®
	Tampon de lavage (1 x) : 20 à 25 °C pendant un maximum de 7 jours; 2 à 8 °C pendant un maximum de 30 jours. Tampon de lavage (10 x) : 2 à 25 °C

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

1. ZEUS Scientific recommande que l'utilisateur prélève les échantillons conformément au document M29 du CLI intitulé « *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease* » (dernière édition).
2. Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale qu'un échantillon de sang humain ne causera aucune transmission d'infection. Par conséquent, tous les dérivés d'échantillons sanguins doivent être considérés comme possiblement infectieux.
3. Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (2, 3). Ne pas utiliser si un anticoagulant ou un agent de conservation a été ajouté. Éviter d'utiliser du sérum sanguin hémolysé, lipémique ou exposé à des bactéries.
4. Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant un maximum de 8 heures. Si aucun test n'est effectué dans un délai de 8 heures, le sérum sanguin peut être stocké à 2 à 8 °C pendant un maximum de 48 heures. Si l'exécution du test est retardée, le sérum sanguin peut être stocké à -20 °C ou moins. Éviter les cycles multiples de gel/dégel pouvant causer une perte d'activité anticorps et produire des résultats erronés. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire (4).

PROCÉDURE D'ESSAI

1. Sortir les composants de leur lieu de stockage et laisser les composants se réchauffer à température ambiante (20 à 25 °C).
2. Déterminer le nombre total de contrôles et d'échantillons à tester. Il est nécessaire d'utiliser un contrôle négatif et trois contrôles positifs dans chaque série d'essais.
   Le contrôle négatif doit être utilisé dans le puits A1, le contrôle positif 1 dans le puits B1, le contrôle positif 2 dans le puits C1 et le contrôle positif 3 dans le puits D1. Utiliser un puits pour chaque contrôle et chaque échantillon à doser.
   a. Afin d'optimiser les temps de lecture, la suspension de billes doit être parfaitement mélangée juste avant son utilisation. Pour resuspendre efficacement les billes, il convient tout d'abord d'agiter la suspension de billes par vortex pendant environ 30 secondes puis d'effectuer une sonication pendant environ 30 secondes dans un bain de sonication léger.
   b. Afin de garantir la réussite de l'essai, il est important que les composants soient minutieusement mélangés. Afin de garantir un mélange adapté des composants, il convient de mélanger la plaque par agitation pendant environ 30 secondes à 800 r/min environ ; ou bien de placer un pipetteur à environ la moitié du volume de la plaque puis d'aspirer et d'expulser (en pompant vers le haut et vers le bas) le contenu du puits ; répéter l'opération au moins 5 fois.

EXEMPLE DE CONFIGURATION DE PLAQUE

	1	2
A	Contrôle négatif	etc.
B	Contrôle positif 1	
C	Contrôle positif 2	
D	Contrôle positif 3	
E	Patient 1	
F	Patient 2	
G	Patient 3	
H	Patient 4	

3. Préparer une dilution 1:21 (p. ex., 10 µl de sérum + 200 µl de SAVe Diluent®) de contrôle négatif, de contrôles positifs et de sérum de chaque patient. **REMARQUE : La solution SAVe Diluent® changera de couleur pour confirmer que l'échantillon a été combiné avec le diluant.** Afin de garantir de bons résultats, il est important que les dilutions d'échantillons soient minutieusement mélangées, conformément à l'alinéa 2b ci-dessus.
4. Après avoir déterminé le nombre total de puits à doser, utiliser une pipette mutlicanaux ou une pipette à répétition pour délivrer 50 µl de billes en suspension dans chaque puits de la plaque de filtration.
5. Transférer 10 µl de chaque échantillon dilué (1:21) et contrôler en comparant la plaque de dilution à la plaque de filtration. Afin de garantir de bons résultats, il est important que les dilutions d'échantillons soient minutieusement mélangées, conformément à l'alinéa 2b ci-dessus.
6. Incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 ± 10 minutes.
7. Après l'incubation, rincer les billes par filtration sous vide à l'aide du tampon de lavage fourni dilué (concentration 1X).
   a. Placer la plaque de filtration sur le distributeur à vide et retirer la solution en laissant les billes.
   b. Arrêter l'aspiration et ajouter 200 µL de solution tampon de lavage diluée (1x).
   c. Créer le vide et retirer la solution.
   d. Répéter les étapes 7b et 7c jusqu'à un total de trois rinçages.
8. Après le dernier lavage, sécher délicatement le fond de la plaque de filtration et laisser sécher la plaque à l'air pendant 3 à 5 minutes avant de passer à l'étape suivante.
9. Ajouter 150 µl de conjugué dans chaque puits, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons. Afin de garantir de bons résultats, il est important que le conjugué et la suspension de billes soient minutieusement mélangés, conformément à l'alinéa 2b ci-dessus. Il est possible, en option, pendant le mélange du conjugué, de transférer le mélange dans des puits vides d'une plaque de réaction en polystyrène.
10. Incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C) pendant 30 ± 10 minutes.
11. Régler l'instrument **AtheNA Multi-Lyte** pour l'analyse des réactions en sélectionnant le calibre ANA-II Plus. Pour les détails concernant le fonctionnement de l'instrument **AtheNA Multi-Lyte,** consulter le manuel d'utilisation. Les résultats peuvent être lus à partir de la plaque de filtration ou de la plaque de réaction. **REMARQUE : Afin de garantir que les analyses d'échantillons soient correctement effectuées, il est important que l'instrument soit préparé, étalonné et conservé conformément aux instructions du fabricant.** Veuillez relire le manuel de préparation de l'instrument avant de lire les résultats de l'essai.
12. Il faut lire la plaque dans les 60 minutes qui suivent la fin de l'incubation du conjugué. Il est possible d'agiter la plaque 15 secondes environ avant de lire les résultats. Cette étape facultative peut permettre de diminuer le temps nécessaire à la lecture de la plaque.

Étape	Procédure d'essai abrégée
1	Diluer les échantillons 1:21 avec le diluant SAVe. Bien mélanger.
2	Mélanger dans un puits vide 50 µl de billes en suspension avec 10 µl d'échantillon dilué. Bien mélanger.
3	Incuber à température ambiante pendant 30 minutes (± 10 minutes).
4	Rincer les microsphères 3 fois avec 200 µl de tampon de lavage 1X.
5	Sécher délicatement le fond de la plaque et laisser sécher à l'air 3 à 5 minutes.
6	Ajouter 150 µl de conjugué dans chaque puits. Bien mélanger.
7	Transférer sur une plaque de réaction (facultatif).
8	Incuber à température ambiante pendant 30 minutes (± 10 minutes).
9	Agiter la plaque (facultatif).
10	Lire les résultats dans les 60 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

1. Lors de chaque essai, il est nécessaire d'inclure le contrôle négatif (dans le puits A1) et trois contrôles positifs (dans les puits B1 à D1).
2. La validité de l'épreuve est définie par la performance des contrôles positifs et du contrôle négatif. Ces critères sont automatiquement analysés avec la *technologie d'étalonnage intra-puits*.
   a. Le contrôle négatif et les trois contrôles positifs doivent tous être négatifs sur les billes porteuses d'anticorps non spécifiques ou témoins.
   b. Le contrôle négatif doit être négatif pour tous les analytes inclus dans le test sur billes en suspension.
   c. Chaque contrôle positif doit être positif pour un groupe d'analytes prédéterminé compris dans la suspension de billes. Chaque contrôle positif doit produire un résultat qualitatif positif d'anticorps antinucléaires (ANA). Outre le résultat qualitatif, chaque contrôle positif doit se situer dans les plages prédéterminées d'activité. Collectivement, chaque population de billes spécifique à un analyte est contrôlée avec le groupe des trois contrôles positifs. Ces intervalles sont codés sur le CD d'étalonnage.
   d. Si l'un des critères ci-dessus n'est pas rempli, l'épreuve tout entière sera considérée comme non valide et devra être recommencée.
3. La validité des échantillons repose sur les caractéristiques des billes d'étalonnage et leurs interactions avec les sérums du patient. Il existe divers paramètres qui sont automatiquement contrôlés avec la *technologie d'étalonnage intra-puits*. Si l'un des critères s'avérait ne pas correspondre aux spécifications, les résultats pour le patient seraient considérés comme non valides et l'épreuve devrait être recommencée. Le cas échéant, le rapport de données indiquera l'échantillon qui a été invalidé ainsi qu'un code de dépannage.
4. Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux réglementations gouvernementales en vigueur et aux normes des organisations d'accréditation compétentes. Les contrôles externes doivent être représentatifs d'un sérum humain normal, car le système d'étalonnage des tests ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** est partiellement basé sur les caractéristiques d'un échantillon de sérum. Si la formulation de l'échantillon est artificielle (pas du sérum humain), des résultats erronés sont possibles.
5. Consulter le document C24 du NCCLS intitulé Statistical Quality Control for Quantitative Measurements [Contrôle de qualité statistique pour les mesures quantitatives] pour connaître les pratiques appropriées en termes de contrôle de qualité.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. **Calculs**
   a. Étalonnage de l'essai : Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte ANA-II Plus** utilise une *technologie d'étalonnage intra-puits*. La *technologie d'étalonnage intra-puits* utilise une courbe d'étalonnage multipoints standard dans la suspension de billes. Grâce à la *technologie d'étalonnage intra-puits*, chaque puits de l'essai est étalonné de l'intérieur sans aucune intervention de l'utilisateur. La courbe standard est conçue pour se régler automatiquement en fonction des caractéristiques propres au sérum du patient ou au sérum témoin. Les valeurs d'étalonnage sont attribuées aux étalons internes par ZEUS. Ces valeurs sont spécifiques pour chaque lot et sont codées sur le CD d'étalonnage accompagnant chaque lot.
   b. Valeurs seuils d'analyte : Une valeur seuil a été assignée à chaque analyte du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus**.** Les valeurs seuils sont déterminées par ZEUS pour chaque lot de tests et sont codées sur le CD d'étalonnage accompagnant chaque lot.
   c. Grâce à la *technologie d'étalonnage intra-puits*, tous les calculs sont effectués automatiquement lors de l'utilisation du système ZEUS **AtheNA Multi-Lyte**. La *technologie d'étalonnage intra-puits* effectue une analyse de régression des étalons internes, puis règle les valeurs unitaires calculées en fonction des étalons supplémentaires et des caractéristiques de l'échantillon de sérum.
2. **Interprétations**
   a. **Interprétation individuelle de l'analyte ANA :** Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus peut générer jusqu'à neuf résultats d'essais individuels pour chaque échantillon de patient testé. Les résultats de tests individuels offerts sont : SSA, SSB, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1, centromère B, ADN bicaténaire et histone. Outre les neuf marqueurs mentionnés ci-dessus, le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus contient une population de billes supplémentaire renfermant une préparation d'antigènes nucléaires dérivée de cellules HEp-2. Cette population de billes contribue au résultat *qualitatif* de l'évaluation de l'échantillon mais cette contribution ne doit pas être considérée comme un résultat distinct. Les valeurs unitaires d'échantillon des analytes multiplexés sont interprétées comme suit :

Échantillons négatifs	< 100
Échantillons positifs	> 120
Échantillons ambivalents	100 à 120

   Les valeurs unitaires utilisées sont UI/ml pour l'ADN bicaténaire et UA/ml pour les autres analytes, conformément aux indications sur les feuilles de résultats du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte**.
   b. **Interprétation qualitative du résultat d'anticorps antinucléaires (ANA) :** Le système de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte ANA-II Plus peut générer un résultat qualitatif d'anticorps antinucléaires (ANA). Ce résultat qualitatif est basé sur les déterminations individuelles indiquées dans l'alinéa 2a ci-dessus. L'interprétation qualitative du résultat ANA doit être réalisée selon les critères suivants :
      i. Les échantillons positifs (>120) pour au moins un des neuf analytes, ou la bille d'antigène nucléaire HEp-2 (HEP-2NA), sont considérés positifs aux anticorps antinucléaires (ANA).
      ii. Les échantillons négatifs (< 100) pour les neuf analytes et les billes HEp-2NA sont considérés négatifs aux anticorps antinucléaires.
      iii. Les échantillons ambivalents (100 à 120) pour au moins un des analytes (incluant les billes HEp-2NA) et négatifs pour les autres analytes sont considérés ambivalents ou limites pour la présence d'anticorps antinucléaires. Les échantillons ambivalents peuvent être répétés en duplicata ou évalués avec une autre procédure sérologique afin de déterminer leur réactivité aux anticorps antinucléaires.
      iv. Il est possible qu'un échantillon ait un résultat qualitatif positif à cause de la réactivité aux billes HEp-2NA avec un résultat négatif pour les neuf autres marqueurs de l'essai. Un tel échantillon possède des anticorps détectables dirigés contre un antigène nucléaire mais pas contre l'un des neuf analytes *spécifiques* contenus dans la suspension de billes.

LIMITES DU TEST

1. Le test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus vise à aider au diagnostic mais n'est pas un diagnostic en soi. Les résultats de test doivent être interprétés conjointement avec l'évaluation clinique et avec les résultats d'autres procédures de diagnostic.
2. Un résultat ANA positif peut être obtenu chez des personnes apparemment saines. Il est donc essentiel que les résultats soient interprétés par une autorité médicale compétente en tenant compte des informations cliniques globales du patient.
3. Les patients souffrant de lupus érythémateux systémique (LES) suivant un traitement à base de stéroïdes peuvent avoir un résultat négatif.
4. Plusieurs médicaments d'usage courant vendus sous ordonnance peuvent créer des anticorps antinucléaires.
5. Des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques peuvent fausser le résultat de cette analyse. Par ailleurs, des échantillons présentant des taux anormaux d'IgG peuvent interférer avec les résultats du test. Il faudra donc éviter d'utiliser de tels échantillons.

RÉSULTATS ATTENDUS

L'essai clinique du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus a été réalisé avec un total de 546 échantillons de trois grandes catégories : donneurs de sang normal (n = 161), échantillons précédemment caractérisés comme réactifs aux auto-anticorps (n=350) et échantillons cliniques/de patient (n = 35) provenant de personnes ayant consulté un médecin dans le cadre d'un trouble rhumatologique. Le groupe d'échantillons cliniques contenait cinq échantillons de chacune des maladies suivantes : syndrome de CREST, lupus induit par un médicament, connectivite mixte, myosite, sclérodermie, lupus systémique et syndrome de Sjögren. Les pourcentages de résultats positifs, négatifs et ambivalents pour chaque essai et chaque groupe d'échantillons sont indiqués ci-dessous dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultats attendus

Nombre de résultats positifs, négatifs et ambivalents pour chaque groupe d'échantillons									
	Normaux (n=161)			Caractérisés (n=350)			Cliniques (n=35)		
	Positif	Négatif	Ambivalent	Positif	Négatif	Ambivalent	Positif	Négatif	Ambivalent
SSA	2	158	1	149	196	5	12	22	1
SSB	0	160	1	83	263	4	6	29	0
Sm	0	161	0	56	290	4	4	31	0
RNP	2	158	1	83	264	3	7	28	0
Scl-70	1	160	0	42	305	3	3	31	1
Jo-1	0	160	1	45	304	1	5	30	0
ADN bicaténaire	0	161	0	48	297	5	1	34	0
Centromère	2	158	1	33	313	4	4	31	0
Histone	0	161	0	43	301	6	0	34	1
ANA	7	151	3	281	65	4	28	5	2
Pourcentage de chaque résultat par rapport à la population									
	% positif	**% négatif**	**% ambivalent**	**% positif**	**% négatif**	**% ambivalent**	**% positif**	**% négatif**	**% ambivalent**
SSA	1,2	98,1	0,6	42,6	56,0	1,4	34,3	62,9	2,9
SSB	0,0	99,4	0,6	23,7	75,1	1,1	17,1	82,9	0,0
Sm	0,0	100,00	0,0	16,0	82,9	1,1	11,4	88,6	0,0
RNP	1,2	98,1	0,6	23,7	75,4	0,9	20,0	80,0	0,0
Scl-70	0,6	99,4	0,0	12,0	87,1	0,9	8,6	88,6	2,9
Jo-1	0,0	99,4	0,6	12,9	86,9	0,3	14,3	85,7	0,0
ADN bicaténaire	0,0	100,0	0,0	13,7	84,9	1,4	2,9	97,1	0,0
Centromère	1,2	98,1	0,6	9,4	89,4	1,1	11,4	88,6	0,0
Histone	0,0	100,00	0,0	12,3	86,0	1,7	0,0	97,1	2,9
ANA	4,3	93,8	1,9	80,3	18,6	1,1	80,0	14,3	5,7

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. **Étude comparative**

Une étude comparative a été réalisée afin de démontrer les caractéristiques de performance du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus par rapport au système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA. Au total, 546 échantillons ont été testés. Les types et les nombres d'échantillons testés sont décrits dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Types d'échantillons inclus dans l'étude comparative

Type	Quantité	Description
Donneur de sang normal	161	Échantillons aléatoires achetés auprès de divers fournisseurs commerciaux.
Échantillons caractérisés	350	Ces échantillons ont été achetés chez plusieurs fournisseurs commerciaux. Ils ont été précédemment caractérisés relativement à leur réactivité aux auto-anticorps (ou absence de réaction) avec plusieurs autres méthodologies. Les échantillons positifs ont été probablement obtenus chez des patients malades.
Échantillons cliniques	5 – Syndrome de CREST 5 – Lupus induit par un médicament 5 – Connectivite mixte 5 – Myosite 5 – LES 5 – Sclérodermie 5 – Syndrome de Sjögren	Ces échantillons ont été achetés chez un fournisseur commercial affirmant qu'ils provenaient de patients diagnostiqués selon les catégories indiquées.

Chacun des échantillons ci-dessus a été testé avec le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus et avec le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA. Les résultats de cette étude comparative ont été utilisés pour calculer la sensibilité relative, la spécificité relative et la concordance relative de chaque essai du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus par rapport à l'essai de référence. Les résultats de cette étude comparative sont résumés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Performances du système de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte ANA-II Plus par rapport au système de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte ANA

Marqueur	Sensibilité relative (%)	Spécificité relative (%)	Concordance relative (%)
SSA	100	93,3	94,9
SSB	100	95,2	95,7
Sm	83,3	98,7	97,0
RNP	98,1	93,7	94,2
Scl-70	95,2	98,8	98,5
Jo-1	100	99,4	99,4
ADN bicaténaire	88,6	97,8	97,2
Centromère	96,2	97,5	97,4
Histone	95,8	96,9	96,8
ANA	99,6	88,3	94,3

Sensibilité et spécificité cliniques du système de test ZEUS AtheNA Multi-Lyte ANA-II Plus

La spécificité clinique du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus a été évaluée avec 161 donneurs de sang normaux avec l'hypothèse que chaque groupe ne contenait aucun cas de maladie auto-immune. Des 161 échantillons testés, sept ont été positifs pour un ou plusieurs marqueurs, trois ont été ambivalents pour un ou plusieurs marqueurs (sans être positifs pour les autres marqueurs) et 151 ont été négatifs pour les 10 résultats d'essais. Pour les neuf systèmes de test individuels, la spécificité clinique des tests ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus se situait entre 98,1 % et 100 %. La spécificité clinique de la partie ANA du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus était de 93,8 %. La sensibilité clinique du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus a été évaluée avec 35 échantillons caractérisés en environnement clinique (patients diagnostiqués). Des 35 échantillons testés, 28 (80 %) ont été positifs pour un ou plusieurs marqueurs du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus. Le résultat des 35 échantillons est indiqué dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Résultats des 35 échantillons cliniques

Maladie	Résultat ANA	SSA	SSB	Sm	RNP	Scl-70	J0-1	ADNbi	Cent	Histone
Crest 1	Positif	6	8	1	9	7	6	24	270	9
Crest 2	Positif	25	3	5	9	4	8	15	394	7
Crest 3	Négatif	8	3	1	3	2	6	12	4	4
Crest 4	Positif	7	3	3	4	3	6	11	352	6
Crest 5	Positif	8	2	14	13	6	5	15	511	9
Lupus IM 1	Négatif	8	3	4	13	10	20	44	13	15
Lupus IM 2	Ambivalent	110	10	4	13	12	23	30	12	26
Lupus IM 3	Positif	971	189	5	7	10	8	16	9	18
Lupus IM 4	Négatif	10	10	89	50	9	28	30	19	57
Lupus IM 5	Positif	670	5	3	6	3	5	31	5	31
C mixte 1	Positif	2	3	24	853	8	8	28	10	8
C mixte 2	Positif	573	443	49	329	9	25	40	20	15
C mixte 3	Positif	11	6	14	188	6	12	26	12	15
C mixte 4	Positif	7	4	164	915	5	9	20	10	9
C mixte 5	Positif	178	3	51	69	10	7	177	10	111
Myosite 1	Positif	6	35	2	11	5	772	19	11	10
Myosite 2	Positif	10	11	4	60	9	1024	22	31	20
Myosite 3	Positif	6	2	4	5	7	1293	18	7	6
Myosite 4	Positif	18	3	10	9	9	1048	18	3	7
Myosite 5	Positif	6	4	4	6	5	946	13	8	6
Sclérodermie 1	Ambivalent	3	3	3	2	103	5	17	7	5
Sclérodermie 2	Positif	8	2	2	4	145	5	20	9	8
Sclérodermie 3	Positif	59	5	2	3	152	6	13	8	5
Sclérodermie 4	Négatif	3	2	3	4	88	3	12	6	6
Sclérodermie 5	Positif	4	2	4	65	549	14	41	28	17
Lupus 1	Positif	504	39	301	432	4	4	21	5	3
Lupus 2	Positif	94	4	284	216	18	3	51	4	29
Lupus 3	Positif	1066	44	9	657	4	5	36	11	6
Lupus 4	Positif	513	2	275	23	11	5	12	3	20
Lupus 5	Négatif	5	3	22	23	10	6	12	3	9
S Sjögren 1	Positif	362	713	1	7	3	8	17	11	10
S Sjögren 2	Positif	128	186	2	1	6	21	10	3	7
S Sjögren 3	Positif	1158	786	2	13	5	12	18	12	5
S Sjögren 4	Positif	861	732	5	8	11	8	17	9	6
S Sjögren 5	Positif	783	9	4	10	8	25	17	16	14

2. **Reproductibilité**

Une étude de précision a été réalisée pour évaluer la précision du système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus. L'étude a été menée comme suit : Huit échantillons ont été testés. Chacun des huit échantillons a été dilué deux fois et chaque dilution a été plaquée quatre fois pour un total de huit duplicata de chaque échantillon. Ce protocole a été répété trois fois, ce qui a permis d'obtenir 24 résultats pour chacun des huit échantillons. Les 24 résultats de chaque échantillon ont été utilisés pour calculer un résultat moyen, l'écart type et le coefficient de variation (%). Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Précision

Nº d'échantillon	Tous les tests	SSA	SSB	Sm	RNP	Scl-70	Jo-1	ADN bicaténaire	Cent B	Histone
Échantillon 1	Moyenne	8	4	3	7	4	9	17	10	8
	ET	1,87	0,88	0,97	1,28	0,90	1,85	2,61	1,71	1,35
	CV (%)	22,7	22,1	28,7	17,3	21,8	21,3	15,4	17,8	16,5
Échantillon 2	Moyenne	903	726	555	190	9	10	20	11	14
	ET	72,33	61,61	55,10	28,25	1,75	1,83	4,39	2,07	2,34
	CV (%)	8,0	8,5	9,9	14,9	19,7	18,0	21,8	18,6	16,2
Échantillon 3	Moyenne	1424	494	35	71	631	1525	663	566	716
	ET	102,87	49,53	5,93	10,02	48,35	113,01	107,69	59,80	75,21
	CV (%)	7,2	10,0	16,8	14,2	7,7	7,4	16,3	10,6	10,5
Échantillon 4	Moyenne	9	5	29	863	10	20	79	30	16
	ET	4,01	1,18	7,06	146,16	2,98	5,51	21,75	5,28	3,99
	CV (%)	42,8	23,6	24,8	16,9	31,3	27,4	27,6	17,6	25,3
Échantillon 5	Moyenne	9	8	3	6	4	8	13	6	7
	ET	2,06	1,63	0,83	1,25	1,01	2,51	2,74	1,28	1,84
	CV (%)	22,7	21,3	29,8	22,6	26,3	30,9	21,0	21,7	26,3
Échantillon 6	Moyenne	861	14	14	212	598	1505	78	784	26
	ET	114,06	4,62	4,52	47,89	72,60	178,50	15,03	106,30	6,52
	CV (%)	13,2	32,6	31,4	22,6	12,1	11,9	19,2	13,6	25,4
Échantillon 7	Moyenne	768	16	29	732	8	1551	57	22	14
	ET	58,79	3,21	3,97	83,25	1,67	120,45	9,71	4,02	2,21
	CV (%)	7,7	20,2	13,7	11,4	20,6	7,8	17,0	18,1	16,3
Échantillon 8	Moyenne	1441	687	303	84	37	19	223	19	525
	ET	79,42	52,09	35,08	13,28	5,96	3,22	35,94	3,40	46,24
	CV (%)	5,5	7,6	11,6	15,8	15,9	16,9	16,1	18,2	8,8

3. **Substances interférentes**

Le système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** ANA-II Plus a fait l'objet d'une évaluation du risque d'interférences provenant de composants sériques. Dans le cadre de cette étude, 20 échantillons ont été évalués avec un système de test ZEUS **AtheNA Multi-Lyte** et avec un test ELISA. Ces 20 échantillons présentaient soit des taux de triglycérides anormaux (n = 5), soit des taux de bilirubine anormaux (n = 5), soit une concentration en IgG au-dessus de la normale (n = 5), soit des taux d'hémolyses au-dessus de la normale (n = 5). Un seul des 20 échantillons testés a présenté un résultat positif.

Tableau 6 : Résumé des substances interférentes

Nº d'échantillon	Résultat qualitatif	SSA	SSB	Sm	RNP	Scl-70	Jo-1	ADN bicaténaire	Cent B	Histone
Triglycéride 1	Négatif	10	5	7	10	31	14	22	8	21
Triglycéride 2	Négatif	17	6	5	8	14	15	23	9	15
Triglycéride 3	Négatif	10	4	7	10	16	16	18	8	18
Triglycéride 4	Négatif	19	8	6	13	14	17	21	10	16
Triglycéride 5	Négatif	16	5	7	10	21	15	19	8	20
Hémoglobine 1	Négatif	20	8	8	24	79	30	18	15	26
Hémoglobine 2	Négatif	20	9	9	17	23	25	25	11	25
Hémoglobine 3	Négatif	16	7	7	15	75	21	19	7	24
Hémoglobine 4	Négatif	42	54	20	30	25	46	66	18	82
Hémoglobine 5	Négatif	10	6	7	10	13	17	24	8	12
IgG+ 1	Négatif	19	22	8	36	46	95	47	21	27
IgG+ 2	Négatif	14	11	6	35	18	45	40	17	16
IgG+ 3	Négatif	13	11	7	21	16	20	38	18	17
IgG+ 4	Positif	113	11	7	15	175	20	46	19	18
IgG+ 5	Négatif	30	9	5	15	40	19	54	19	16
Bilirubine 1	Négatif	16	5	8	19	57	18	34	18	21
Bilirubine 2	Négatif	10	6	15	33	81	26	27	19	26
Bilirubine 3	Négatif	10	5	5	8	19	18	16	8	10
Bilirubine 4	Négatif	9	5	4	5	13	12	16	10	10
Bilirubine 5	Négatif	16	6	6	10	17	18	24	18	15

RÉFÉRENCES

1. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
3. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. 2nd edition. Approved Standard (1984). Published by National Committee for clinical Laboratory Standards.
4. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.

ZEUS Scientific

ZEUS Scientific, Inc.
200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
Appel gratuit (É-U) : 1-800-286-2111, Option 2
International : +1 908-526-3744
Fax: +1 908-526-2058
Site Web: www.zeusscientific.com

AtheNA Multi-Lyte et SAVe Diluent® sont des marques de commerce de ZEUS Scientific, Inc.

Service clients aux États-Unis : contactez votre distributeur local.
Assistance technique aux États-Unis : contactez ZEUS Scientific ; appelez pi écrivez à support@zeusscientific.com.
Service clients et assistance technique hors des États-Unis : contactez votre distributeur local.

© 2015 ZEUS Scientific, Inc. Tous droits réservés.

EC REP
EMERGO EUROPE
Molenstraat 15
2513 BH, The Hague
The Netherlands
Tel: +31 (0)70 345 8570
Fax: +31 (0)70 346 7299